

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

細胞内輸送障害とアルツハイマー病：神経活動の変化に着目した アルツハイマー病の発症・進行メカニズム解明を目的とする研究（19-17）

主任研究者 木村 展之 国立長寿医療研究センター 病因遺伝子研究室長

研究要旨

これまでの研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系の障害が老化に伴う β アミロイド蛋白質 ($A\beta$) の神経細胞内蓄積を引き起こす要因であることを明らかにしたが、細胞内に蓄積した $A\beta$ がどのようなメカニズムで細胞外へ出て老人斑を形成するのかは未だ不明である。また、 $A\beta$ 病理（老人斑）から Tau 病理（神経原線維変化）への移行プロセスや、それら病変の進行・拡大がどのように認知症の発症につながるのかについても不明な点が多く、認知症発症を予防・抑制する薬剤を開発するためには一刻も早い真相解明が望まれている。

近年、アルツハイマー病（AD）患者の脳内では認知症を発症する以前から神経活動に変化が見られることや、NMDA 受容体（NMDAR）を介したシナプス抑制（LTD）が Tau のリン酸化を促すことなどが次々と報告され、Tau 病理の形成や認知症の発症に神経活動の変化が関わっている可能性が示唆されている。エンドサイトーシスは神経伝達物質の放出や取込に必須の細胞機能であることから、老化に伴うエンドサイトーシスの障害は神経活動を変化させることで AD 病理の移行や認知症発症に関与している可能性が高い。

そこで本研究は、細胞内のみならず細胞外も含めた総合的な膜輸送系の変化に着目し、エンドサイトーシスの障害が AD 病変の形成や神経活動に及ぼす影響を明らかにすることで、AD の発症・進行メカニズムの解明につなげることを目指す。

主任研究者

木村 展之 国立長寿医療研究センター 病因遺伝子研究室長

分担研究者

多田 敬典 国立長寿医療研究センター 神経内分泌研究室長

A. 研究目的

AD 患者の脳組織には老人斑 ($A\beta$ 病理) と神経原線維変化 (Tau 病理) という特徴的な二大病変が形成され、病変の進行・拡大とともに認知症の発症に至ると考えられている。

このため、 $A\beta$ や Tau といった病変蛋白質の排除を目的とする AD 治療・予防薬の開発が続けられているが、残念ながら現時点では好ましい結果は得られていない。一方、これら AD の二大病変はヒト以外の動物の脳組織でも老年性に形成されるため、それら病変自体は脳の老化や機能障害の程度を示す指標とも考えられ、老化に伴う病変形成メカニズムを明らかにすることは、脳の老化を食い止めて認知症発症を予防する新しい薬剤ターゲットの同定につながる可能性が期待できる。

研究代表者・木村はこれまでの研究成果により、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞内輸送系の障害が老化に伴う $A\beta$ の神経細胞内蓄積を引き起こす要因であることを明らかにしたが、細胞内に蓄積した $A\beta$ がどのようなメカニズムで細胞外病変である老人斑形成に至るのか、また、エンドサイトーシスの障害と Tau 病理形成との関係性については不明な点が多い。AD 患者の脳では認知症発症以前から神経活動に変化が見られることが知られているが、近年の研究報告により、 $A\beta$ が NMDA 受容体 (NMDAR) に結合してその機能を障害することや、シナプス外 NMDAR の刺激によるシナプス長期抑制 (LTD) が Tau のリン酸化や蓄積を引き起こすことなどが相次いで明らかとなり、神経活動の変化はアルツハイマー病理の移行と認知症発症の双方に関わっている可能性が示唆されている。

そこで本研究は、細胞内のみならず細胞外も含めた総合的な膜輸送系の変化に着目し、エンドサイトーシスの障害が AD 病変の形成や神経活動に及ぼす影響などを明らかにすることで、老化に伴う AD の発症・進行メカニズムの解明につなげることを目指す。

B. 研究方法

(木村)

昨年度の研究成果により、細胞内に蓄積した $A\beta$ はエクソソームを介して細胞外へ排出されている可能性が示唆された。そこで今年度はまず、神経系セルラインである **Neuro2a** 細胞を用いてエクソソーム産生および分泌に関連する因子のノックダウン解析を行い、 $A\beta$ の細胞外排出におけるエクソソームの重要性を検証した。また、脳内におけるエクソソーム分泌系の老年性変化を明らかにするため、若齢 (10 歳以下)、中等齢 (11 歳以上 25 歳未満)、および老人斑の形成が認められる老齢 (25 歳以上) カニクイザルから採取した脳組織を用いて、エクソソーム関連因子の動態を免疫組織化学的および生化学的に検索した。

(多田)

昨年度の研究成果により、軸索輸送モーター蛋白質 **Dynein** の機能低下はプレシナプス・ポストシナプス双方の機能低下を介して神経活動を減弱させることが明らかとなった。そこで今年度は、培養 21 日目の成熟ラット初代培養神経細胞を用いて、各種シナプス受容体のアゴニスト、およびアンタゴニストを処理して、 Tau の質的变化 (例：リン酸化など) および量的変化について検索を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた研究については、「動物の愛護及び管理に関する法律」に基づいた動物福祉規定に則り、実験動物の飼育・安楽殺・実験作業を遂行した。具体的には、動物を飼育する場所・ケージ・管理方法に配慮し、可能な限り動物の使用数減少と被る苦痛の減退に努め、所属機関の動物実験規定を遵守して研究を行った。

C. 研究結果

(木村)

Neuro2a 細胞を用いてエクソソーム形成に必須の ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) 因子である TSG101、および intraluminal membrane vesicles (細胞外へエクソソームとして排出される小胞内微小胞) を内包する多胞体を細胞膜へと輸送する際に重要な働きをする Rab27 をロックダウンした結果、 $A\beta$ の細胞外排出が著しく減少することが明らかとなった。また、ラット初代培養神経細胞にラパマイシンを用いてエクソソーム分泌を人為的に阻害したところ、やはり同様に細胞外への $A\beta$ 分泌が著しく低下し、有意な $A\beta$ の細胞内蓄積が誘導された。

若齢から老齢まで、様々な年齢のカニクイザル脳組織を用いてエクソソーム関連因子の検索を行ったところ、Alix などのエクソソームマーカー蛋白質に大きな量的変化は確認されなかった。一方、免疫組織化学的検索により、老齢カニクイザルでは神経細胞内の Alix 陽性顆粒数が著しく減少し、神経網等の細胞内局在性が増加していた。また、各種エクソソームマーカー蛋白質と $A\beta$ との免疫二重染色を行った結果、全てのエクソソームマーカー蛋白質が老人斑に認められた。

(多田)

培養 21 日目以降の成熟したラット初代培養神経細胞を用いて、AMPA 受容体、NMDA 受容体、GABA 受容体に対する様々なアゴニスト・アンタゴニストを処理して Tau の質的・量的変化を生化学的に検索した。その結果、AMPA 受容体および NMDA 受容体に対するアゴニストを処理した場合、30 分間の短期刺激では Tau のリン酸化や量的に大きな変化は認められず、24 時間以上の慢性刺激では神経細胞死が誘導されるのみであった。一方、GABA 受容体阻害薬である bicuculline や 4-aminopyridine、picrotoxin を処理したところ、30 分間の短期刺激では大きな変化は見られなかったものの、24 時間以上の刺激によって内因性 Tau の有意な減少が確認された。

続いて、NMDA 受容体のアゴニストである NMDA とアンタゴニストである MK801 を併用して LTD を人為的に誘導した結果、やはり 30 分間の刺激では大きな変化は認められなかったが、24 時間の慢性刺激により、Tau の著しいリン酸化亢進と細胞内蓄積が認められた。興味深いことに、これら Tau の質的・量的変化は、NMDA 受容体アンタゴニストである MK801 や AP5 の単独処理のみでも再現されることが明らかとなった。

D. 考察と結論

(木村)

Neuro2a 細胞を用いた研究成果により、エクソソームは細胞内・外の A β レベルを制御するシステムとして重要な役割を果たしている可能性が示唆された。尚、本研究では外因性アミロイド前駆体蛋白質の遺伝子導入は一切行っていないため、エクソソームは真に内因性 A β の細胞内・外バランスに影響することが明らかとなった。また、ラット初代培養神経細胞でもエクソソーム分泌の阻害が細胞内 A β の蓄積を誘導することが明らかとなったことから、Neuro2a 細胞で確認された実験結果の妥当性が検証された。

一方、様々な年齢のカニクイザル脳組織を用いた検索により、エクソソーム関連因子の蛋白質レベルは大きな変動を示さなかったものの、老齢カニクイザル脳ではエクソソームの細胞内局在が著しく減少し、神経網などの細胞外領域において免疫陽性反応の増強が確認された。これらの結果はあくまでも状況証拠に過ぎないが、エクソソームは老化に伴い細胞外への局在性が増加している可能性が示唆された。さらに、各種エクソソームマーカー蛋白質と A β との免疫二重染色により、全てのエクソソームマーカー蛋白質が老人斑に認められたことから、老化に伴う A β 病理の進行 (=細胞内 A β 蓄積から細胞外への老人斑沈着へ) にエクソソームが重要な役割を担っている可能性が大いに示唆された。

(多田)

培養 21 日目以降の成熟したラット初代培養神経細胞を用いた検索により、各種神経伝達物質受容体の短時間刺激では Tau に大きな変動は見られないことが明らかになった。今回、我々はシナプス局所翻訳が Tau の蛋白質レベルに影響する可能性を考慮して 30 分間の刺激を試みたが、質的变化はより短時間で生じている可能性も考えられる。今後は、より早期の反応を検索する予定である。一方、NMDA を使用した LTD 誘導のみならず、NMDA 受容体アンタゴニストの単独処理によっても、24 時間の慢性処理により Tau の著しいリン酸化亢進と細胞内蓄積が認められたことから、NMDA 受容体の機能不全が Tau の病的変化に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。NMDA 受容体の機能不全は細胞内・外カルシウムイオンバランスの異常を引き起こすため、昨年度まで当研究部に在籍していた木村哲也博士の研究成果とも一致する結果である。また、昨年度の研究成果により、我々は Dynein の機能低下がプレ・ポストシナプスの機能を減弱させることを明らかにしている。これらの結果から、老化に伴う Dynein の機能低下はシナプス機能の減弱による LTD の発生や NMDA 受容体の機能不全を介して Tau の病的変化を促進している可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiguro A, Kimura N, Noma T, Shimo-Kon R, Ishihara A, Kon T. Molecular dissection of ALS-linked TDP-43 - involvement of the Gly-rich domain in interaction with G-quadruplex mRNA. FEBS Lett. 2020; 594(14): 2254-2265.
- 2) 多田敬典. 内分泌系の加齢変化と脳認知機能.
老年内科, 2(6), 2020.
- 3) 多田敬典. 社会的認知機能における攻撃性制御の意義と分子機序の解明.
日本生理学会雑誌, AWARDS, 81(2):25, 2019.

2. 学会発表

- 1) Kimura N, Koinuma S, Shimozawa N, Yasutomi Y.
Autophagy regulates intracellular/extracellular A β levels via exosome secretion.
第 43 回日本基礎老化学会, 2020 年 5 月 27 日, 長崎県長崎市 (誌上開催)
- 2) 木村 展之, 鯉沼 真吾, 下澤 律浩, 保富 康宏.
老化に伴う A β 病理形成メカニズムの解析: オートファジーの低下はエクソソームを介して細胞外への A β 排出を促進する.
第 63 回日本神経化学学会, 2020 年 9 月 11 日, 東京都八王子市 (Web 開催)
- 3) 木村 展之, 鯉沼 真吾, 下澤 律浩, 保富 康宏.
Abeta 排出機構としてのエクソソームの重要性.
第 39 回日本認知症学会, 2020 年 11 月 26-28 日, 愛知県名古屋市 (オンサイト・Web ハイブリッド開催)
- 4) Tada H, Yasuda K, Nakashima A, Suzuki K, Tokunaga A, Akagi K.
Paramylon, a β -1,3-Glucan from *Euglena gracilis*, extends lifespan and diminishes age-related neuromuscular decline.
第 43 回日本基礎老化学会, 2020 年 5 月 27 日, 長崎県長崎市 (誌上開催)
- 5) 多田敬典, 元井章智, 元井里奈, 赤木一考.
露地栽培アガリクス(KA21 株)の寿命、筋・神経系に対する効果の検討.
第 100 回日本獣医麻酔外科学会学術集会, 2020 年 6 月 21 日, 埼玉県大宮市 (Web 開催)
- 6) 多田敬典.
加齢に伴うストレス内分泌変化が脳認知機能に及ぼす影響.
第 62 回日本老年医学会学術集会「エイジングサイエンスフォーラム～最新老化研究から新しい健康概念へ」, 2020 年 8 月 5 日, 東京都新宿区 (Web 開催)
- 7) 多田敬典.
精神神経疾患における攻撃性制御の意義と分子機序の解明.

第 163 回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理学・毒性学会シンポジウム, 2020 年 9 月, 山口県山口市 (Web 開催)

8) 多田敬典, 元井章智, 元井里奈, 赤木一考.

露地栽培アガリクス(KA21 株)の加齢性運動機能低下に対する効果の検討.

第 20 回日本抗加齢医学会総会, 2020 年 9 月, 東京都港区 (Web 開催)

9) Tada H.

Age-related glucocorticoid endocrinological regulation involved in social cognitive function.

AOCE-SICEM 2020, 2020 年 10 月, Korea (Virtual)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。